

## Aislamiento y cuantificación de los componentes de la hoja del olivo: extracto de hexano

Por **Á. Guinda\***, **A. Lanzón**, **J.J. Rios** y **T. Albi**

Instituto de la Grasa (CSIC). Avda. Padre García Tejero, 4. 41012-SEVILLA  
e-mail: [guinda@cica.es](mailto:guinda@cica.es)

### RESUMEN

**Aislamiento y cuantificación de los componentes de la hoja del olivo: extracto de hexano.**

Se analizan los principales componentes del extracto de hexano de hojas de olivo, siguiendo un esquema analítico basado en la extracción con hexano y posterior separación de grupos de compuestos, según su polaridad, mediante cromatografía en columna y en capa fina. Se separan e identifican los siguientes componentes: hidrocarburos, ceras ésteres, triglicéridos, tocoferoles, esteroides, alcoholes lineales y terpénicos y dialcoholes terpénicos. Se han estudiado las hojas de olivo de cinco variedades: Picual, Arbequina, Hojiblanca, Empeltre y Cornicabra, los rangos del contenido, en ppm, de algunos compuestos resultaron: hidrocarburos saturados, 2.057-3.400; escualeno, 38-152; ceras ésteres, 915-1.874;  $\beta$ -caroteno, 28-100; triglicéridos, 832-1.396;  $\alpha$ -tocoferol, 41-125;  $\beta$ -sitosterol, 714-2.500; alcoholes totales 95-311 y dialcoholes terpénicos, 342-837.

**PALABRAS-CLAVE:** Análisis - Componentes liposolubles - Hoja de olivo.

### SUMMARY

**The isolation and quantification of the components from olive leaf: hexane extract.**

The principal components of the hexane extract from olive leaves are analysed, following an analytical procedure based on the extraction with hexane and the later separation of groups of compounds, according to their polarity, by means of column and thin-layer chromatographies. The following components are separated and identified: hydrocarbons, ester waxes, triglycerides, tocopherols, sterols, lineal and terpenic alcohols and terpenic dialcohols. The olive leaves from five different varieties were analyzed: Picual, Arbequina, Hojiblanca, Empeltre and Cornicabra; the concentration of some compounds ranged between: 2.057-3.400 ppm saturated hydrocarbons; 38-152 ppm squalene; 915-1.874 ppm ester waxes; 28-100 ppm  $\beta$ -carotene; 832-1.396 ppm triglycerides; 41-125 ppm  $\alpha$ -tocopherol; 714-2.500 ppm  $\beta$ -sitosterol; 95-311 ppm alcohols and 342-837 ppm terpenic dialcohols.

**KEY-WORDS:** Analysis - Liposoluble compound - Olive leaf.

## 1. INTRODUCCIÓN

Es conocida la gran importancia que tiene, tanto económica como social, el cultivo del olivar en el área mediterránea, con más de 8 millones de hectáreas cultivadas (98% del mundial), y las industrias derivadas directamente del mismo, como son la de

extracción del aceite de oliva y la de elaboración de aceitunas de mesa. Hasta ahora son muy numerosos los estudios realizados sobre los dos productos, aceite y aceituna, no así los de algunos de los subproductos del citado cultivo, como la hoja del olivo, que bien llegan a las almazaras con las aceitunas o proceden de la poda anual. Vázquez-Roncero (1969), Mussini (1975), Heimler (1992) y Bianchi (1993) han analizado algunos extractos de la hoja del olivo y han encontrado, entre otros compuestos,  $\alpha$ -amirina y ácidos terpénicos; sobre las posibles aplicaciones de sus componentes, Zarzuelo (1991) y González (1992) han comprobado la actividad hipoglucémica y el efecto vasodilatador de extractos de la hoja del olivo. Esto hace que su estudio evolucione constantemente y, que en sintonía con el avance de la tecnología y con las nuevas tendencias del consumo, se vayan desarrollando nuevas estrategias de aprovechamiento de este subproducto, (Georgoudis, 1997), (Molina, 1996), (Fiestas, 1996), (Pickard, 1996), (Van Putte, 2000) y (Coll-D, 2000).

El valor potencial, en compuestos de alto valor añadido en la hoja del olivo es muy elevado, lo que hace que el estudio de su composición tenga un gran interés, además de científico, práctico.

El objetivo de este trabajo es contribuir a un mayor conocimiento cualitativo y cuantitativo de la composición de la hoja del olivo para el mejor aprovechamiento de este subproducto del olivar.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Material y Aparatos

Hojas de olivo de árboles, de más de diez años de antigüedad, de cinco variedades (picual, hojiblanca, arbequina, empeltre y cornicabra) procedentes de la Estación de Olivicultura y Elayotecnia de Jaén, recolectadas en diciembre de 2000.

Hexano y éter etílico Scharlau PA; diisopropil-éter Merck PA; metanol, hexano y acetronitrilo Romil para HPLC. Patrones de n-eicosano, araquidato de colesterol, araquidato de laurilo, tripalmitina, heneicosanol y colesterol, Sigma 99%; ácido betulínico, Aldrich 90%;  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -sitosterol, SigmaSyntetic 95%. Placas de sílice Macherey-Nagel de 20x20 cm.

Cromatógrafos Hewlett Packard 5890 y Chrom-pack 9000. Sistema de adquisición y tratamiento de datos Konikrom Chromatography Data System. Cromatógrafo líquido Perkin Elmer Serie 400, con detector de fluorescencia Chimazu RF 535. Espectrofotómetro UV-VIS, Beckman DU 640.

## 2.2. Preparación del extracto

Las hojas, se lavan con agua destilada a temperatura ambiente y se secan en estufa de vacío a 35 °C y una presión de 10 mm de Hg durante 24 horas. Posteriormente se trituran (Robot Coupe, R6VV) y se extraen con hexano por dos procedimientos (empleándose en ambos casos, 5 g): a) en Soxhlet durante 6 horas; el extracto se reduce a 10 mL del que se toman 5 mL para la separación posterior de los componentes, y b) mediante maceración en 100 mL, durante 48 horas, de esta disolución se toma una alícuota de 50 mL, para el fraccionamiento posterior.

## 2.3. Fraccionamiento del extracto de hexano

A las porciones alícuotas antes reseñadas (5 y 50 mL), se le añaden como patrones internos: 0.3 mg de n-eicosano, 2 mg de colesteril araquidato, 0.2 mg de lauril araquidato, 0.25 mg de tripalmitina, 0.1 mg de heneicosanol y 0.2 mg de colesterol. En ambos casos se elimina el disolvente, en evaporador rotativo, hasta aproximadamente 1 mL y se cromatografía en columna. Se emplea una columna de 45 cm de longitud x 1.5 cm de diámetro interior rellena con 20 g de silicagel (Kieselgel 60, 90-230 mesh, Merck), activada una hora en estufa a 140 °C y, añadiéndosele agua hasta el 5%. El relleno se realiza por vía húmeda con hexano, la elución se lleva a cabo secuencialmente con 5 volúmenes de 100 mL de disolventes de menor a mayor polaridad, n-hexano, hexano-éter etílico 95:5, 87:13, 65:35 y éter etílico.

## 2.4. Determinación de los componentes de cada fracción

En la figura 1 se muestra un esquema de la metodología empleada en las determinaciones. La primera fracción (F1), conteniendo los hidrocarburos saturados, se lleva a sequedad en rotavapor y se redissuelve en 1 mL de hexano, analizándose por CG con columna capilar de sílice SPB-5 (Supelco, Inc.), de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película, con detector de ionización de llama, según el método descrito por Guinda, (1996). De la segunda fracción (F2), que contiene la mayoría de los pigmentos carotenoides, se toma una alícuota de 10 mL, evaporándola y disolviendo el residuo en 10 mL de hexano, analizándose el β-caroteno mediante espectrofotometría visible (Mínguez-Mosquera, 1986). De esta misma

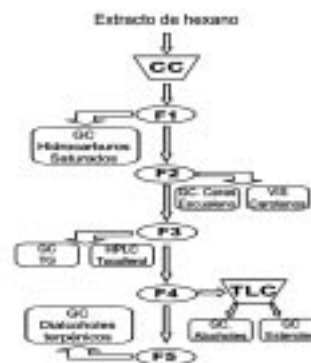


Figura 1

Esquema de la metodología para la separación y cuantificación de los componentes del extracto de la hoja de olivo.

fracción (F2) se analizan, mediante cromatografía gaseosa, el escualeno y las ceras, para lo cual se evaporan los 90 mL restantes, redissolviendo el residuo en 500 µL de hexano y analizándose por CG con columna capilar Rtx-65TG (Restek, 35% dimetil-65% difenil polisiloxano) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.1 µm de espesor de película. Las condiciones cromatográficas empleadas fueron: presión en cabeza 120 Kpa, gas portador hidrógeno, inyección en split/mode, temperatura inicial: 255 °C, temperatura final: 350 °C, rampa: 4 °C/min., inyector: 340 °C, detector: 350 °C, tiempo inicial: 2 min. La cuantificación se realiza, como es común, mediante la relación de áreas, de modo que el área del patrón araquidato de laurilo se emplea para cuantificar el escualeno y las ceras obtenidas en los primeros 20 minutos mientras para el resto de las ceras se toma como referencia el araquidato de colesterilo. La composición de las ceras fue analizada mediante hidrólisis de las mismas según el método siguiente: entre 100 y 130 mg de extracto se disuelven en unas 20 gotas de benceno o tolueno y se le añaden 5 mL de metilato sódico 0.2 N, hirviendo a reflujo unos minutos hasta la formación de una fase homogénea, puesta esta disolución en capa fina y desarrollando con hexano: éter 80:20 se observan dos bandas de Rf 0.8 y 0.2 correspondientes a los ésteres metílicos y a los alcoholes procedentes de la metanolisis de dichas ceras, que se determinan por CG según el método para la determinación de los ácidos grasos (AOCS, 1997) y el descrito por Lanzón (1999) para la determinación de alcoholes lineales y terpénicos. Para el análisis de la tercera fracción (F3), conteniendo triglicéridos y tocoferoles, se toma una alícuota de 50 mL y se evapora, redissolviéndose el residuo en 200 µL de hexano y determinándose los triglicéridos por CG empleando columna capilar Rtx-65TG y detector de ionización de llama según el método descrito por Carelli, (1993). Los tocoferoles se determinaron concentrando los restantes 50 mL de la F3 a 5 mL y analizándose

los mediante HPLC, según el método de la IUPAC, (1992). La cuarta fracción (F4) se lleva a sequedad en rotavapor y se le añade 1 mL de éter isopropílico, procediéndose al fraccionamiento de sus componentes por cromatografía en capa fina; el líquido de desarrollo empleado fue hexano/éter 65:35. Las bandas con Rf 0,20 y 0,45 una vez rascadas, se eluyen con éter isopropílico, determinándose los esteroides mediante CG (Lanzón 1998) y, los alcoholes lineales y terpénicos según Lanzón (1999). Para el análisis de la quinta fracción (F5), conteniendo los dialcoholes terpénicos, se lleva a sequedad, se redissuelve el residuo en 1mL de éter isopropílico, fraccionándose mediante cromatografía en capa fina empleándose como líquido de desarrollo hexano/acetato de etilo (2:1, V/V) con el 0,5% de ácido acético. Se rasca la banda de Rf 0,25 y se eluye con 10 mL de éter isopropílico. La disolución se lleva a sequedad, se le añaden 200  $\mu$ L de reactivo de silanización (piridina/hexametilsilazano/trimetilcloroxilano 9:3:1) y, transcurrido 10 min. se analiza por CG siguiendo el método descrito por Albi (2001).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento de las extracciones, tanto por sohxlet como por maceración, se realizó mediante pesada, dando un valor similar de  $\approx 14\%$  (m/m). La composición de los extractos, obtenidos por maceración, de las cinco variedades estudiadas, se muestran en la tabla I siendo, en todos los casos, cada valor media de tres determinaciones. No se muestran los resultados de las determinaciones mediante extracción en sohxlet, ya que no presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto a los de la tabla I. La variedad picual presenta los valores mayores en todos los componentes estudiados excepto en los tocoferoles que son superiores en la variedad arbequina.

Los hidrocarburos saturados de las cinco variedades, oscilan entre 2.057 y 3.400  $\mu$ g/g, siendo el contenido de la variedad cornicabra el menor de todos, en la fig.2 se muestra un cromatograma del análisis de los hidrocarburos saturados de la variedad picual, el pico señalado con una P corresponde al patrón interno de n-eicosano, los hidrocarburos

Tabla I  
Composición (ppm) de los principales componentes <sup>a</sup> del extracto de hexano de cinco variedades de hojas de olivo

Muestra	Ceras <sup>b</sup>	Hidrocarburos <sup>c</sup>	Escualeno <sup>d</sup>	$\beta$ -caroteno <sup>d</sup>	Triglicéridos <sup>b</sup>	$\alpha$ -tocoferol <sup>d</sup>	$\beta$ -sitosterol <sup>c</sup>	Alcoholes <sup>d</sup>	Dialcoholes Triterpénicos <sup>b</sup>
Picual	1874	3400	152	100	1396	117	2500	311	837
Arbequina	1200	2700	49	81	1215	125	1560	95	412
Hojiblanca	1415	2530	111	72	1108	89	1734	98	563
Empeltre	915	3050	38	28	934	62	614	213	630
Cornicabra	934	2057	46	45	832	41	714	110	342

<sup>a</sup> Valores medios de tres determinaciones.; <sup>b</sup> CV  $\leq 3\%$ ; <sup>c</sup> CV  $\leq 5\%$ ; <sup>d</sup> CV  $\leq 2\%$ .

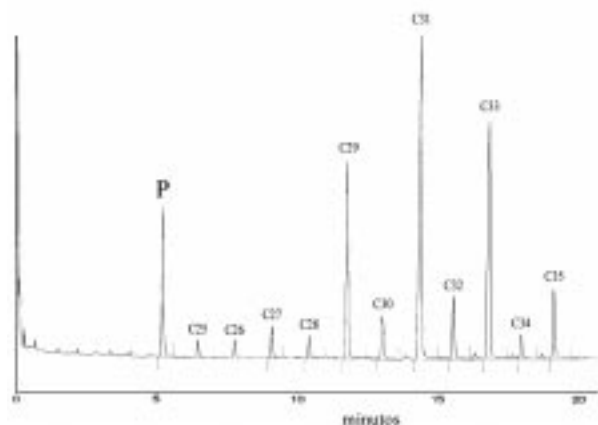


Figura 2  
Cromatograma de los hidrocarburos lineales saturados de la hoja de olivo, variedad picual.

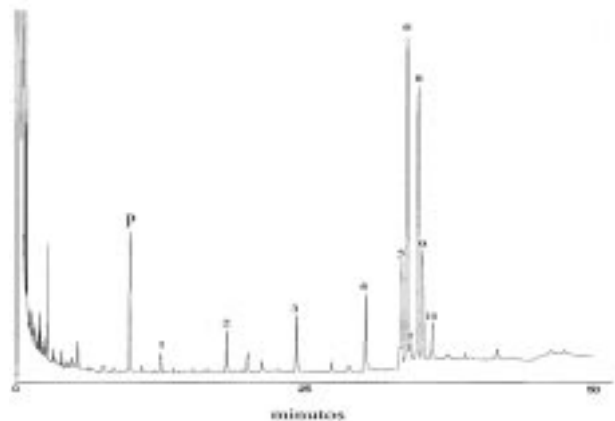


Figura 3  
Cromatograma de los alcoholes saturados y terpénicos de la hoja de olivo, variedad picual.

C29, C31 y C33 son mayoritarios en todas las variedades estudiadas. La cuantía en ceras varió entre 915 y 1874  $\mu\text{g/g}$ , y su composición, analizada según descrito en el apartado anterior, resultó constituida por los ácidos grasos y alcoholes terpénicos de la hoja de olivo (palmitico, oleico y linoleico;  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina). Los contenidos en triglicéridos varían entre 832 y 1396  $\mu\text{g/g}$  y, la trioleína y la palmitodioleína son, en todos los casos, los triacilglicérols mayoritarios en la hoja del olivo. Entre los tocoferoles y carotenos, los más abundantes fueron el  $\alpha$ -tocoferol y el  $\beta$ -caroteno y sus contenidos variaron entre 41-125 y 28-100  $\mu\text{g/g}$  respectivamente. En la cuarta fracción el  $\beta$ -sitosterol aparece siempre como claramente mayoritario entre los esteroides, estando comprendido los contenidos totales entre 614 y 2.500  $\mu\text{g/g}$ . La figura 3 muestra un cromatograma de los alcoholes lineales y terpénicos de hoja de olivo de la variedad picual, el pico P corresponde al patrón heneicosanol, los picos señalados con el 1, 2, 3, 4 y 7 fueron identificados por cromatografía gaseosa y por espectrometría de masa como los alcoholes lineales: docosanol, tetracosanol, hexacosanol, octacosanol y triacontanol, el 5 corresponde al germanicol, el 6 a la  $\beta$ -amirina el 8 a la  $\alpha$ -amirina; es de destacar en esta fracción, la presencia del pico 9 del cromatograma que es un isómero de la  $\beta$  y  $\alpha$ -amirina; por último indicar que el pico 10 tiene un espectro de masa, no identificado. Las cuantificaciones totales de los alcoholes lineales y terpénicos están comprendidas, en las cinco variedades estudiadas entre 95 y 311  $\mu\text{g/g}$ , siendo, la  $\beta$  y  $\alpha$ -amirina las mayoritarias. Por último indicar que los dialcoholes terpénicos encontrados en la hoja del olivo, y cuyos valores totales oscilan entre 342 y 837  $\mu\text{g/g}$ , son el eritrodol y el uvaol, sus valores son siempre superiores los del uvaol en las hojas al contrario que en el aceite de oliva que es siempre superior el eritrodol.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT) por la financiación del presente Proyecto CÓDIGO AGL 2000-1531-C02-01. Los autores agradecen su colaboración en la parte experimental a la auxiliar de laboratorio Dña. Guadalupe Fernández Arévalo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Albi, T., Guinda, A. y Lanzón, A. (2001) Procedimiento de obtención y determinación de ácidos terpénicos de la hoja del olivo (*Olea europaea*). *Grasas y Aceites*, **52**, 275-278.
- AOCS (1997) "Fatty Acid Composition by GLC. Ce 1-62". In *Methods and Recommended Practices of the AOCS*; Champaign, Illinois. 3<sup>rd</sup> ed.
- Bianchi, G., Vlahov, G., Anglani, C. And Murelli, C. (1993) Epicuticular wax of olive leaves. *Phytochemistry*, **32**, 49-52.
- Carelli, A. and Cert, A. (1993). Comparative study of the determination of triacylglycerol in vegetable oils using Chromatographic techniques. *J. Chromatography*, **630**, 213-222.
- Coll-D., Mathonnet-JP. and Zannini-G. 2000. Dietetic and/or cosmetic preparation comprising a mixture of lycopene and olive leaf extract. French-Patent-Application.
- Fiestas, J.A. and Borja, R. (1996). Biomethanization. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **38**, 145-153.
- Georgoudis, D. (1997). Method of extraction of olive paste from vegetable waste and its use as foodstuff. PCT-International-Patent-Application. WO 97/28089.
- González, M., Zarzuelo, A., Gamez, M.J., Utrilla, M.P., Jiménez, J., and Osuna, I. (1992). Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Med*, **58**, 513-515.
- Guinda, A., Lanzón, A. and Albi, T. (1996). Differences in hydrocarbons of virgin olive oils obtained from several olive varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1723-1726.
- Heimler, D., Pieroni, A., Tattini, M. and Cimato A. (1992). Determination of flavonoid glycoside and biflavonoids in *Olea europaea* L. Leaves. *Chromatographia*, **33**, 369-373.
- IUPAC. (1992). "Determinations of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by HPLC". In *Standard Methods for the Analysis of oils, fats and Derivatives*; Blackwell, Oxford, 7th ed.
- Lanzón, A., Albi, T. and Guinda, A. (1999). Formation of a delta 7 triterpene alcohol in refined olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 1421-1423.
- Lanzón, A., Guinda, A. y Albi, T. (1998) Pérdidas de componentes menores del aceite de oliva virgen en la refinación. *Inf. Tecnol.*, **9**, 63-68.
- Mínguez-Mosquera, M.I. and Garrido-Fernández, J. (1986) Identificación de pigmentos carotenoides en frutos de distintas variedades de olivo (*Olea europaea*, L.). *Grasas y Aceites*, **37**, 272-276.
- Molina, E. and Nefzaoui, A. (1996). Recycling of olive oil by-products: possibilities of utilization in animal nutrition. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **38**, 227-235.
- Mussini, P., Orsini, F. and Pelizzoni, F. (1975) Triterpenes in leaves of *Olea europaea*. *Phytochemistry*, **14**, 1135-1139.
- Pickard, M.D., Jones T.J. and Tyler, R.T. (1996). "By-products utilization". In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Vol. 4, 603-630.
- Van Putte, Karel Petrus A. M. (Unilever N.V.; Unilever PLC, Neth.) *Process for preparing foods products fortified with oleanolic acid*. Eur Pat. Appl. EP 1013752 A1 28 jun 2000, 9pp.
- Vázquez-Roncero, A. y Janer ML (1969) Ácidos triterpénicos del olivo. *Grasas y Aceites*, **20**, 133-137.
- Zarzuelo, A., Duarte, J., Jiménez, J., González, M. And Utrilla, M.P. (1991) Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med*. **57**, 417-419.

Recibido: Febrero 2002  
Aceptado: Mayo 2002